

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-220457

(43)Date of publication of application : 26.08.1997

(51)Int.Cl.

B01F 7/16  
C08B 15/00  
C12M 1/02  
C12P 19/04

(21)Application number : 08-052621

(71)Applicant : BIO POLYMER RES:KK

(22)Date of filing : 16.02.1996

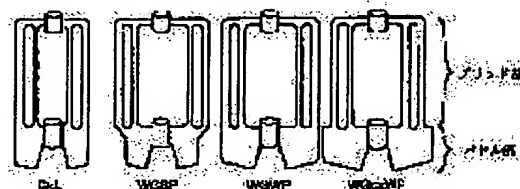
(72)Inventor : KODA TORU  
YANO HISATO  
YOSHINAGA FUMIHIRO

(54) GATE TYPE BLADE FOR AGITATING HIGH NON-NEWTONIAN FLUID

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To use a gate type blade on aerating agitation to obtain a high oxygen capacity coefficient by making the ratio of the blade diameter in a grid part of an agitator equipped with a gate type blade to the tank inner diameter be a specified value or more.

**SOLUTION:** The ratio of the blade diameter in a grid part of a agitator equipped with a gate type blade to the tank diameter is made to be  $\geq 0.6$ , preferably  $\geq 0.65$ . And of gate type blades, it is better that a bottom paddle part or a bottom turbine part is integrated into a grid part, and that the blade diameter of a bottom part or a bottom turbine part is smaller than that of a grid part. In this way, in this case a fluid having high non-Newtonian property is agitated, for example, when cellulose producing bacteria are aeration agitated and cultured, the gate type-blade is particularly profitably used.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of extinction of right]

【物件名】

甲第一号証

【添付書類】

甲  
第  
一  
号  
証

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-220457

(43) 公開日 平成9年(1997)8月26日

(51) Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 F 7/16			B 0 1 F 7/16	P
C 0 8 B 15/00			C 0 8 B 15/00	
C 1 2 M 1/02			C 1 2 M 1/02	A
C 1 2 P 19/04			C 1 2 P 19/04	C

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-52621

(22) 出願日 平成8年(1996)2月16日

(71) 出願人 593041273

株式会社バイオポリマー・リサーチ  
神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号

(72) 発明者 幸田 徹

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号  
株式会社バイオポリマー・リサーチ内

(72) 発明者 矢野 善人

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号  
株式会社バイオポリマー・リサーチ内

(72) 発明者 吉永 文弘

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号  
株式会社バイオポリマー・リサーチ内

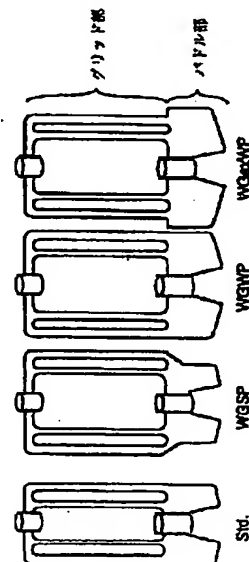
(74) 代理人 弁理士 川原田 一穂 (外1名)

(54) 【発明の名称】 高非ニュートン流体攪拌用門型羽根

(57) 【要約】

【課題】 高いニュートン性を有する流体の攪拌に使用した際に、高い酸素容量係数 ( $k_L a$ ) が得られる攪拌装置を提供すること。

【解決手段】 グリッド部に於ける異径の槽内径に対する比が0.6以上であることを特徴とする門型羽根を備えた攪拌装置及び該装置の非ニュートン性の高い流体の攪拌への使用。



門型羽根装置の各種形状

(2)

特開平9-220457

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリッド部に於ける翼径の槽内径に対する比が0.6以上であることを特徴とする門型羽根を備えた攪拌装置。

【請求項2】 ボトムバドル部又はボトムタービン部に於ける翼径がグリッド部に於ける翼径よりも小さいことを特徴とする請求項1記載の門型羽根を備えた攪拌装置。

【請求項3】 非ニュートン性の高い流体の攪拌に使用する為の請求項1又は2記載の攪拌装置。

【請求項4】 セルロース生産菌の培養に使用する為の請求項1又は2記載の攪拌装置。

【請求項5】 請求項1又は2に記載の攪拌装置を発酵槽として用いてセルロース生産菌を通気攪拌培養し、セルロース性物質を製造する方法。

【請求項6】 請求項1又は2記載の攪拌装置のセルロース生産菌の培養への使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、平板翼にグリッドを形成するような開口部を有する、いわゆる「門型羽根」であって、その形状に特徴を有する門型羽根を備えた攪拌装置及び該装置を用いた、セルロース性物質を生産する能力を有する微生物（以下、「セルロース生産菌」という。）に属する菌体を培養し、セルロース性物質（以下、「バクテリアセルロース」又は「BC」という。）を製造する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】BC（バクテリアセルロース）は可食性であり食品分野で利用されるほか水系分散性に優れているので食品、化粧品又は塗料等の粘度の保持、食品原料生地の強化、水分の保持、食品安定性向上、低カロリー添加物又は乳化安定化剤としての産業上利用価値がある。BCは木材パルプ等から製造されるセルロースに比べ、フィブリルの断片幅が2ケタ程度も小さいことを特徴とする。従って、BCの離解物はマイクロフィブリルのかかる構造的物理的特徴に基づき高分子、特に水系高分子用補強剤として各種の産業用途がある。このようなセルロース性離解物を紙状または固型状に固化した物質は高い引張弾性率を示すのでマイクロフィブリルの構造的な特徴に基づくすぐれた機械特性が期待され、各種産業用素材としての応用がある。

【0003】BCの製造方法に関しては、特開昭62-265990号、特開昭63-202394号及び特公平6-43443号等にBCの製造方法に関する記載がある。セルロース生産菌の培養を行なう際に適当とされている栄養培地としては、炭素源、ペプトン、酵母エキス、燐酸ナトリウム及びクエン酸からなる Schramm/He

strin 培地 (Schramm ら, J. General Biology, 11, p.123-129, 1954) が知られている。また、このよう

な栄養培地に、培地中の特定栄養素によるセルロース生成促進因子である、イノシトール、フィチン酸及びピロロキノリンキノン (PQQ) (特公平5-1718号公報; 高井光男, 紙バ技協誌, 第42巻, 第3号, 第237~244頁) 等を添加したり、更には、カルボン酸又はその塩 (特願平5-191467号)、インペルターゼ (特願平5-331491号) 及びメチオニン (特願平5-335764号) を添加することによって、セルロース性物質の生産性が向上することが見出されている。又、特定の範囲の酸素移動容量係数 ( $k_1 a$ ) の条件下でセルロース生産菌を培養する方法も提案されている (特願平7-31787号)。更に、発酵槽の内圧を一定以上に保ちながらセルロース生産菌を培養する方法も提案されている (特願平7-276408号)。また、従来より、微生物を培養する培養形式としては、静置、振盪もしくは通気攪拌培養等が用いられてきた。また、培養操作法としては、いわゆる回分発酵法、流加回分発酵法、反復回分発酵法及び連続発酵法等が使用されてきた。尚、攪拌手段としては、例えばインペラー (攪拌羽根)、エアリフト発酵槽、発酵プロセスのポンプ駆動循環、及びこれら手段の組合せ等が使用されている。インペラーの種類としては、門型羽根、タービン羽根、ヘリカルリボン羽根及びスクリュウ羽根等が知られている。

【0004】一般に、工業的な発酵プロセス一般に於いては、培養の酸素要求量を通気と攪拌で充足させている。しかし、多くの発酵プロセスでは発酵槽の酸素供給能で生産性が律速されており、従って、微生物の培養に際して酸素供給に影響を与える要因を検討することは重要であると考えられる。培養系で空気中の酸素が菌体に移動するに際して、気泡から液相への酸素移動は次式によって代表される。

$$[数1] \quad dC_t / dt = k_1 a (C^* - C_t) = H k_1 a (P_t - P_t^*)$$

$dC_t / dt$ : 酸素移動速度 (mmol/L・hr)

$k_1 a$ : 酸素移動容量係数 (hr<sup>-1</sup>)

$C_t$ : 培養液中の溶存酸素濃度 (mmol/L)

$C^*$ : 気泡の酸素分圧と平衡な溶存酸素濃度 (mmol/L)

$H$ : ヘンリー定数

$P_t$ : 気相中の酸素分圧 (加圧すると高まる)

$P_t^*$ : 液相中の酸素分圧

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】さて、従来から、種々の攪拌特性に優れた攪拌槽として、ボトムバドル部とグリッド部を一体化した門型羽根を備えた装置が「マックスブレンド」(住友重機械工業株式会社) という商標名で各種知られている。しかしながら、この攪拌槽の優れた特性は、カルボキシメチルセルロース (CMC) のような非ニュートン性の低い模擬液を用いて評価されたも

(3)

特開平9-220457

3  
 のであり、BCのような非ニュートン性の高い液体で実際に評価された例はない。溶液の非ニュートン性は、以下に示す指数関数モデル (Power Law モデル) で近似したときの Power Law Index (n) で表され、この値が小さいほど、平均剪断速度に対する見かけ粘度の変化が大きい、即ち、非ニュートン性が高いといえる。

【数2】

$$\eta_{sp} = K |\dot{\gamma}|^{(n-1)}$$

$\eta_{sp}$  は見かけ粘度、K は consistency index、  
 【外1】

7  
 は平均剪断速度、n は Power law index である。n は各剪断条件における K のパラツキが最小になるように定める。因みに、この (n) 値は、CMC が 0.8、キサンタンガムが 0.3 に対して、BC は 0.1 と非常に小さく、BC の懸濁液又は培養液は非ニュートン性が高いことが判る。

【0006】一般に、非ニュートン性の高い流体では剪断に対する見かけ粘度の変化が大きいため、混合においては流体と羽根との距離が小さいことが望ましく、従って大型羽根が適していると考えられるが、大型羽根は消費動力に対する剪断力が弱く、酸素移動に必要な気泡の剪断には不適当であると考えられる。また、スパージャーに近いボトムパドル部またはボトムタービン部における気泡の剪断は重要であり、この部分の吐出流によって全体の流動性が向上することも期待できるが、強すぎる吐出流によっては羽根近傍に空気のかたまりが生じ、逆に流動性を低下させる可能性も懸念される。これまでに、非ニュートン性の高い流体において酸素移動を高めるためにスパージャー近傍の羽根形状を検討した例はない。本発明者等は、上記認識にもとづき、非ニュートン性の高い流体における酸素移動と発酵生産の研究の結果、特定の形状をした門型羽根を備えた攪拌装置を、例えば BC 懸濁液や BC 培養液への通気攪拌に際して使用すると、高い酸素容量係数 ( $k_L a$ ) が得られることを見だし、培養においても高い生産性が得られることを見だし、本発明を完成させた。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、グリッド部に於ける翼径の槽内径に対する比 ( $d/D$ ) が 0.6 以上、好ましくは 0.65 以上であることを特徴とする門型羽根を備えた攪拌装置に係わる。グリッド部の側面が傾斜しても良く、その場合は、最小幅に於けるグリッド部の翼径の比とする。本発明の門型羽根に於いては、ボトムパドル部又はボトムタービン部はグリッド部と一体化している方が好ましく、それらの翼径 ( $d$ ) ( $P$ ) がグリッド部に於ける翼径 ( $d$ ) よりも小さいものがより好ましい。本発明の攪拌装置は、非ニュート

4  
 ン性の高い流体を攪拌するような場合、例えば、セルロース生産菌を通気攪拌培養する際に、特に有利に使用することができる。尚、本発明の門型羽根の構造・形状に関するその他の点、例えば、グリッドの形状・数、ボトムパドル部ないしボトムタービン部の形状・数、パドル部面積の占める割合及び翼の厚さ等は、当業者が目的等に応じて適宜選択し得る。又、本発明方法を実施するに際しては、前述の培養形式・培養操作法に加えて、特願平6-192287号に記載されている「培養装置と浮上分離装置及びウェッジフィルター等の分離装置の間で菌体を含む培養液を循環させるセルロース性物質の製造方法であって、該分離装置に於いて、生産物であるセルロース性物質を菌体及び培養液から分離することを持徴とする、前記方法」を採用することもできる。

【0008】本発明において使用されるセルロース生産菌は、例えば、BPR2001株に代表されるアセトバクター・キシリナム・サブスピーシーズ・シュクロファーマメンタンス (*Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans*)、アセトバクター・キシリナム (*Acetobacter xylinum*) ATCC23768、アセトバクター・キシリナム ATCC23769、アセトバクター・パスツリアヌス (*A. pasteurianus*) ATCC10245、アセトバクター・キシリナム ATCC14851、アセトバクター・キシリナム ATCC11142 及びアセトバクター・キシリナム ATCC10821 等の酢酸菌、その他に、アグロバクテリウム属、リゾビウム属、サルシナ属、シュードモナス属、アクロモバクター属、アルカリゲネス属、アエロバクター属、アゾバクター属及びズーグレア属並びにそれらを NTG (ニトロソグアニジン) 等を用いる公知の方法によって変異処理することにより創製される各種変異株である。尚、BPR2001株は、平成5年2月24日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託され (受託番号 FERM P-13466)、その後1994年2月7日付で特許手続上の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づく寄託 (受託番号 FERM B P-4545) に移管されている。

【0009】NTG 等の変異剤を用いての化学的変異処理方法には、例えば、Bio Factors, Vol. 1, p.297-302 (1988) 及び J. Gen. Microbiol., Vol. 135, p.2917-2929 (1989) 等に記載されているものがある。従って、当業者であればこれら公知の方法に基づき本発明で用いる変異株を得ることができる。また、本発明で用いる変異株は他の変異方法、例えば放射線照射等によっても得ることができる。本発明の製造方法に用いる培地の組成物中、炭素源としてはシュクロース、グルコース、フラクトース、マンニトール、ソルビトール、ガラクトース、マルトース、エリスリット、グリセリン、エチレングリコール、エタノール等を単独或いは併用して使用することができる。更にはこれらのものを含有する澱粉水解

(4)

特開平 9-220457

5

6

物、シトラスモラセス、ビートモラセス、ビート搾汁、サトウキビ搾汁、柑橘類を始めとする果汁等をシュクロースに加えて使用することもできる。また、窒素源としては硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸塩、尿素等有機物、または無機の窒素源を使用することができ、或いは Bact-Peptone、Bact-Soytone、Yeast-Extract、豆濃などの含窒素天然栄養源を使用してもよい。有機微量栄養素としてアミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、2, 7, 9-トリカルボキシー 1Hピロロ[2, 3, 5]-キノリン-4, 5-ジオン、亜硫酸パルプ廃液、リグニンスルホン酸等を添加してもよい。

【0010】生育にアミノ酸等を要求する栄養要求性変異株を使用する場合には、要求される栄養素を補添することが必要である。無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩、コバルト塩、モリブデン酸塩、赤血塩、キレート金属類等が使用される。更に、前述のセルロース生成促進因子を適宜培地中に添加することもできる。例えば、酢酸菌を生産菌として用いる場合には、培養の pH は 3 ないし 7 に、好ましくは 5 付近に制御する。培養温度は 10~40℃、好ましくは 25~35℃ の範囲で行う。培養装置に供給する酸素濃度は 1~100%、望ましくは 21~80% であればよい。これら培地中の各成分の組成割合及び培地に対する菌体の接種等は培養方法に応じて当業者が適宜選択し得るものである。

【0011】本発明の方法によって製造される BC は菌体はそのまま回収してもよく、さらに本物質中に含まれる菌体を含むセルロース性物質以外の不純物を取り除く処理を施すことができる。不純物を取り除くためには、水洗、加圧脱水、希酸洗浄、アルカリ洗浄、次亜塩素酸ソーダ及び過酸化水素などの漂白剤による処理、リゾチ\*

\*ームなどの菌体溶解酵素による処理、ラウリル硫酸ソーダ、デオキシコール酸などの界面活性剤による処理、常温から 200℃ の範囲の加熱洗浄などを単独及び併用して行い、セルロース性物質から不純物をほぼ完全に除去することができる。このようにして得られた本発明でいうセルロース性物質とは、セルロース及び、セルロースを主鎖としたヘテロ多糖を含むもの及び  $\beta$ -1, 3、 $\beta$ -1, 2 等のグルカンを含むものである。ヘテロ多糖の場合のセルロース以外の構成成分はマンノース、フラクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、ラムノース、グルクロン酸等の六炭糖、五炭糖及び有機酸等である。尚、これ等の多糖が単一物質である場合もあるし 2 種以上の多糖が水素結合等により混在してもよい。

【0012】

【発明の実施の形態】以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明する。

【0013】

【実施例】

## 20 実施例 1

2 重量% のバクテリアセルロースを含み、かつ塑性粘度が 15~20 ポイズであるような模擬液を全量 3 L のガラス製ジャーファーマンターである培養装置の 60% に張り込んだ状態で攪拌回転数の変化に対する  $k_L a$  の値を測定した。表 1 に示す各種形状の門型攪拌羽根を回転させながら窒素を通気することにより溶存酸素濃度をおよそ 0% 飽和状態とした模擬液に、次に酸素分圧 20~21% の空気を通気し、これによって上昇する溶存酸素濃度を溶存酸素電極を用いて測定した。得られた結果を図 2 に示す。

【0014】

【表 1】

門型羽根	$d/D$	$d(P)/D$
標準 (Std.)	0.5	0.5
WGSP	0.65	0.5
WGWP	0.65	0.65
WG <sub>1</sub> WP	0.65	0.8

$$d/D = (\text{グリッド部に於ける翼径}) / (\text{槽内径})$$

$$d(P)/D = (\text{ボトム部に於ける翼径}) / (\text{槽内径})$$

【0015】 $k_L a$  は前記 (数 1) 式より求められるが、簡便には、5~30 秒毎に溶存酸素濃度を測定し、時間  $t_1$  での溶存酸素濃度  $DO_1$  と時間  $t_2$  での溶存酸素濃度  $DO_2$  から以下の式で  $k_L a$  を求める。

$$((DO_2 - DO_1) / (t_2 - t_1)) / (C^* - (DO_1 + DO_2) / 2)$$
  
、単位 (1/hr) (但し、式中  $C^*$  は気泡の酸素分圧と平衡な溶存酸素濃度)

50 平衡な溶存酸素濃度)

(5)

特開平9-220457

## 【0016】実施例2

以下の条件で、本発明の製造方法を実施した。BPR2001株から得られた変異株であって高重合度セルロース生産菌であるBPR3001A株(平成7年6月12日付寄託済、受託番号FERM P-14982)を以下の条件で培養した。

培養条件: 表1に示した各種の門型羽根を備えた培養装置には50L容ジャーファーマンターを用い、培地はCSL-Fru培地(表2、表3及び表4参照)をジャー\*

培地組成

## CSL-Fru

フルクトース	7.0 (%)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.3
ビタミン混合液	1.0
塩類混合液	1.0
CSL (コーンステープリカー)	4.0
pH	5.0

\*ファーマンター内で殺菌して用いた。張り込み液量は30L、通気量は15L/分である。ルーフラスコやコンカル・フラスコを用いて培養した菌液を植菌し、30℃に保温しながら約35時間培養した。通気中及び排気中の酸素濃度はオンライン酸素濃度計を用いて測定した。得られた結果を図3に示す。

【0017】

【表2】

## 【0018】

※ ※ 【表3】

## ビタミン混合物

化合物	mg/L
イノシトール	200
ナイアシン	40
ピリドキシンHCl	40
チアミンHCl	40
パントテン酸カルシウム	20
リボフラビン	20
p-アミノ安息香酸	20
葉酸	0.2
ビオチン	0.2

## 【0019】

【表4】

## 塩類混合液

クエン酸鉄アンモニウム	1.5 g/L
塩化カルシウム	1.5 g/L
モリブデン酸アンモニウム	0.1 g/L
硫酸亜鉛7水塩	0.2 g/L
硫酸マンガン4水塩	0.1 g/L
硫酸銅5水塩	2 mg/L

分を除去した後、1N NaOH水溶液中で80℃、20分間処理して菌体を除去した。さらに、洗浄液が中性付近になるまで生成セルロースを水洗した後、80℃で12時間真空乾燥して乾燥重量を測定することで求めた。

【図面の簡単な説明】

【図1】 表1に示した各種門型羽根の実際の形状を示す。

【図2】 攪拌回転数とk<sub>L</sub>aとの関係を示す。

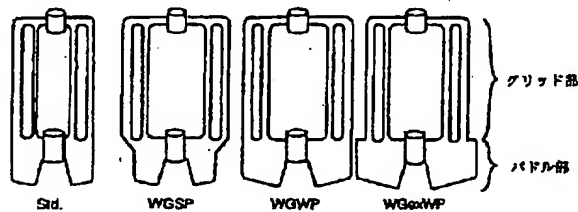
【図3】 各培養装置を用いた場合のBC蓄積量の経時変化を示す。

【0020】尚、図3中、BC蓄積量(g/L)は、培養終了後、培養液中の固形物を集積し、水洗して培地成

(6)

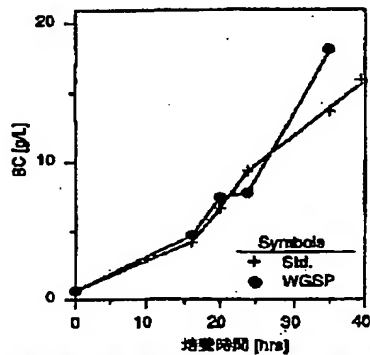
特開平 9-220457

【図1】



門型攪拌羽根の各種形状

【図3】



各種培養装置を用いた場合のBC蓄積量の経時変化

【図2】

